

**Gehalt an niedermolekularem Inhibitor
und α_1 -Antitrypsin
unter physiologischen und pathophysiologischen
Bedingungen**

**(Untersuchungen zur Proteasenhemmkapazität
des menschlichen Bronchialsekrets)**

Gabriele Conradi

1974
2



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41556029_0020

Aus der Hals- Nasen- Ohren-Klinik der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Direktor: Prof. Dr. H.H.Naumann

Gehalt an niedermolekularem Inhibitor und α_1 -Antitrypsin
unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen
(Untersuchungen zur Proteasenhemmkapazität des
menschlichen Bronchialsekrets)

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Gabriele Conradi
aus Meersburg

München 1973



Dekan: Prof. Dr. med. W.Spann

Referent: Priv.Doiz.Dr.rer.nat. K. Hochstraßer

Korreferent: Prof. Dr. med. H.H. Naumann

Tag der mündlichen Prüfung: 30.7.1974

INHALTSVERZEICHNIS

=====

	<u>Seite</u>
<u>THEORETISCHER TEIL</u>	
Einleitung	1
1. Begriffserklärungen	1
a) Definition und Funktion der Proteasen und ihrer Inhibitoren	1
b) Theorie der Wechselwirkung zwischen Protea- sen und deren Inhibitoren	2
c) Bekannte physiologische Funktionen von Pro- teaseninhibitoren im Organismus	2
d) Proteaseninhibitoren der oberen Luftwege .	4
e) Charakterisierung des α_1 -Antitrypsin	4
f) Charakterisierung des niedermolekularen Inhibitors	5
2. Voraussetzungen zur Ausführung der Untersu- chungen	5
<u>ERGEBNISTEIL</u>	8
Darstellung der Anteile der verschiedenen Inhibi- toren an der Gesamthemmstoffkapazität des Bron- chialsekrets	10
Tabelle der untersuchten Fälle	11
Fortsetzung der Ergebnisse	16

	<u>Seite</u>
<u>EXPERIMENTELLER TEIL</u>	
Material und Methoden	18
Bestimmung der Gesamthemmkapazität	18
Bestimmung der auf α_1 -Antitrypsin entfallenden Hemmkapazität	19
Prinzip der einfachen radialen Immundiffusion ...	19
Mancini-Test: Durchführung und Geräte	22
DISKUSSION	24
ZUSAMMENFASSUNG	28
LITERATURVERZEICHNIS	29

Theoretischer Teil =====

Einleitung

1. Begriffserklärungen

a) Definition und Funktion der Proteasen und ihrer Inhibitoren

Proteasen sind eiweißspaltende Enzyme. Man unterscheidet zwischen Endopeptidasen und Exopeptidasen. Endopeptidasen spalten die Proteine innerhalb der Peptidketten; zu ihnen gehören Pepsin, Trypsin, Chymotrypsin, Plasmin, Kallikrein, Bakterienproteasen sowie die Kathepsine der Gewebe und der weißen Blutzellen.

Exopeptidasen greifen die Proteine vom Ende der Peptidketten her an, wobei zwischen Carboxypeptidasen und Amino-peptidasen unterschieden wird, je nachdem sie vom Carboxylende bzw. vom Aminoende der Peptidkette her wirken.

Die physiologische Funktion der Proteasen besteht darin, Fremdeiweiß der Nahrung in ihre Bausteine zu zerlegen und sie dem Stoffwechsel zuzuführen. Die katheptischen Enzyme, die in den Lysosomen der Zellen lokalisiert sind, dienen der intrazellulären Verdauung funktionslos gewordener Zellbestandteile oder von phagozytiertem Material. Leukozyten, deren Hauptaufgabe darin besteht pathogene Bakterien durch Phagozytose zu zerstören, enthalten besonders wirksame lysosomale Proteasen. Diese werden in die Umgebung freigesetzt, wenn z.B. bei Entzündungen Leukozyten aus dem Intra-vascularraum austreten und zerfallen. Sie wirken dann als Entzündungsmediatoren.

b) Die Theorie der Wechselwirkung zwischen Proteasen und deren Inhibitoren

Natürliche Proteaseninhibitoren sind Proteine mit wechselndem Molekulargewicht, die mit Proteasen Komplexverbindungen eingehen und so die Wirkung der Proteasen inhibieren. Die Mechanismen, die zur Hemmung der Proteasen führen, sind weitgehend geklärt. (1-5) Die Hemmung von Trypsin kommt dadurch zustande, daß eine an definierter Stelle des Moleküls lokalisierte basische Aminosäure (Arginin oder Lysin) an das aktive Zentrum des Trypsins angelagert wird. Es kann sich eine echte kovalente Bindung zwischen der Guanidogruppe des Arginins oder der ϵ -Aminogruppe des Lysins und dem Serin-OH des aktiven Zentrums des Trypsins ausbilden. Der Inhibitor ist also ein Substrat für das Enzym; es bildet sich ein Enzymsubstratkomplex. Infolge der spezifischen Raumstruktur (3) der Inhibitoren unterbleibt jedoch die Folgereaktion, die zu freiem Trypsin und zu Reaktionsprodukten führen würde; die proteolytische Reaktion ist blockiert. Der Hemmvorgang kommt also infolge einer limitierten Proteolyse des Inhibitors zustande. Aus Trypsininhibitorkomplexen kann freier Inhibitor zurückgewonnen werden, der durch Lösen der das aktive Zentrum des Inhibitors bildenden Peptidbindung modifiziert ist.

c) Bekannte physiologische Funktionen von Proteaseninhibitoren im Organismus

Die Wirkungen der Proteaseninhibitoren sind vielfältig. Sie haben eine entscheidende Funktion im Kallikrein-Kinin System. Bei jeder akuten Entzündung wird durch Gewebsproteasen, die im entzündeten Gewebe freigesetzt werden,

sowie durch Bakterienproteasen und proteolytische Enzyme zerfallender Leukozyten das entzündungsverstärkende Kallikrein-Kinin System aktiviert. Dieses bewirkt eine Blutdrucksenkung und Erhöhung der Gefäßpermeabilität; auch hat es Einfluß auf die Schmerzentstehung und bei Schockzuständen. Die endogenen Proteaseninhibitoren wie α_1 -Antitrypsin, α_2 -Makroglobulin oder exogene Inhibitoren vermögen jedoch hemmend in dieses System einzugreifen.

Auch bei der Blutgerinnung können Proteaseninhibitoren wirksam werden. So vermag Antithrombin III und α_2 -Makroglobulin als Thrombin-Inaktivator zu wirken (5).

Mit den inaktiven Proteasenvorstufen des Pankreas werden gleichzeitig Proteaseninhibitoren sezerniert, die eine vorzeitige Aktivierung der Proteasen im Pankreasgangsystem verhindern können (2).

Weiterhin wurde bei verschiedenen Krankheiten, so beim Carcinom und bei unspezifischen Entzündungen eine Erhöhung des α_1 -Antitrypsins des Serum festgestellt (5). Es könnte angenommen werden, daß dies ein gegenregulatorischer Effekt als Antwort auf gesteigerten Verbrauch von α_1 -Antitrypsin ist. Andererseits zeigte sich, daß bei erblichem α_1 -Antitrypsinmangel vermehrt Lungenemphyseme auftraten (6, 7, 8, 9). Dies wird damit erklärt, daß die Hemmung von Proteasen aus zerfallenden Leukozyten und Bakterien in den Lungenalveolen nicht mehr gewährleistet ist. Die genannten Enzyme vermögen Lungengewebe anzudauen (10).

d) Proteaseninhibitoren der oberen Luftwege

Im Bereich der oberen Luftwege finden sich zwei Proteaseninhibitoren:

1. das schon länger bekannte α_1 -Antitrypsin;
2. ein niedermolekularer Inhibitor, der im Arbeitskreis Hochstraßer gefunden wurde.

Die prozentuale Beteiligung beider Inhibitoren an der Gesamthemmkapazität des Bronchialsekrets ist der Gegenstand dieser Untersuchungen.

e) Charakterisierung des α_1 -Antitrypsin

α_1 -Antitrypsin wurde 1955 erstmals von Schultze und Mitarbeitern beschrieben und als 3-5 Glykoprotein bezeichnet (11). Seine Eigenschaft als Trypsininhibitor - sie macht ungefähr 90 % der Gesamt-Trypsin-Inhibitor Kapazität des menschlichen Serum aus - erkannte man 1962 (12).

Außer α_1 -Antitrypsin finden sich im Serum noch fünf andere Proteaseninhibitoren: α_1 -Antichymotrypsin, Inter α trypsininhibitor, Antithrombin III, C $\bar{1}$ -Inaktivator und α_2 -Makroglobulin; deren gesamte Konzentration beträgt aber nur 40 % von der α_1 -Antitrypsinkonzentration und 10 % der Gesamthemmung.

α_1 -Antitrypsin ist ein sogenannter polyvalenter Inhibitor. Es hemmt Trypsin, Chymotrypsin, Plasmin, Elastase, Pankreas-Kallikrein, Plasma-Kallikrein (5), Acrosin (13) und leukozytäre Proteasen (10, 14).

Sein Molekulargewicht beträgt 45000.

Der chemischen Struktur nach ist es ein Glykoprotein mit einem Kohlehydratanteil von 12 %. Bei seiner Aminosäurezusammensetzung fällt auf, daß es kein Cystin enthält, was auf einen Mangel an Disulfidbrücken schließen läßt. Daher erklärt sich auch die rasche Inaktivierung bei pH-Werten unter 5 (5).

f) Charakterisierung des niedermolekularen Inhibitors

Der niedermolekulare Inhibitor ist noch nicht so lang bekannt wie die oben genannten Proteaseninhibitoren. Folgendes kann über ihn gesagt werden: er ist polyvalent; in seinem Hemmspektrum ähnelt er dem α_1 -Antitrypsin. Der Inhibitor hemmt Trypsin, Chymotrypsin, Pronase, und - was für diese Untersuchung wichtig ist - auch leukozytäre Proteasen. Er ist gegenüber Enteiweißungsmitteln wie Perchlorsäure und Trichloressigsäure stabil und kann durch sie nicht gefällt werden.

Das Molekulargewicht beträgt 14000 (15, 16).

2. Voraussetzungen zur Ausführung der Untersuchungen

Im Arbeitskreis Hochstraßer wurde bewiesen, daß im Bereich der oberen Luftwege neben dem aus dem Serum transsudierten α_1 -Antitrypsin noch ein niedermolekularer Proteaseninhibitor vorhanden ist. Dieser wird wahrscheinlich vom Flimmerepithel sezerniert und macht 70 % der gesamten Hemmkapazität aus.

Für diese Untersuchungen wurde von intubierten Patienten

gewonnenes und konzentriertes Sekret durch Gelfiltration fraktioniert. Es zeigte sich an zwei Stellen des Elutionsdiagramms antitryptische Wirkung (16), die von zwei verschiedenen molekularen Anteilen von Bronchialsekretinhibitoren verursacht wurden.

Weiteres Aufarbeiten und Untersuchen ergab, daß 30 % der Hemmwirkung von einem höhermolekularen Inhibitor ausgeht; MW 45000, während 70 % der antitryptischen Aktivität der niedermolekulare Inhibitor ausmacht; MW 14000.

Der höhermolekulare Inhibitor wurde als Δ_1 -Antitrypsin identifiziert.

Daraufhin wurden von laryngektomierten Patienten größere Sekretmengen entnommen und konzentriert. Nach Behandlung in der Druckdialysekammer, in der das Material unter intensivem Rühren eingeengt wurde, zeigte das Konzentrat keine antitryptische Wirkung mehr. Durch diesen Vorgang werden die im Sekret laryngektomierter Patienten immer vorhandenen Leukozyten zerstört und dadurch proteolytische Enzyme freigesetzt.

Die Vermutung lag nahe, daß die Inhibitoren mit diesen Proteasen einen Komplex bilden und damit inaktiviert würden. Danach läge der Inhibitor im gebundenen Zustand vor. Durch eine Denaturierung der Proteasen müßte bei Gültigkeit dieser Annahme der Inhibitor aus den Komplexen wieder freigesetzt werden können. Diese Enteiweißung kann mit 5 %iger Perchlorsäure durchgeführt werden. Sie fällt die im Bronchialsekret enthaltenen Proteine, sowie Leukozyten- und Bakterienproteasen aus. Nach der Säurebehandlung und dem Zentrifugieren war die inhibitorische Wirkung im Überstand Trypsin gegenüber wieder nachweisbar. Allerdings mußte angenommen werden, daß im Sekret vorhandenes Δ_1 -Antitrypsin irreversibel zerstört wurde. Somit wäre eine Verminderung der inhibitorischen Aktivität des Bronchialsekrets um etwa 30 % zu erwarten. Das Gegenteil trat ein:

die nach der Saurebehandlung im Bronchialsekret auftretende inhibitorische Aktivität war größer als zuvor. Offensichtlich setzt die Behandlung mit Perchlorsäure bereits in situ vorhandene, durch Leukozyten- und Bakterienproteasen gebundene und damit inaktive Inhibitoren frei, wodurch die Erhöhung der inhibitorischen Aktivität erklärt werden konnte (17). Bei der Gelfiltration von säurebehandeltem Sekret wird nur niedermolekularer Inhibitor gefunden.

Die hier referierten Ergebnisse legten nahe, daß in einem Sekret wechselnde Mengen von freiem, aktivem und maskiertem, an Proteasen gebundenem, inaktivem Inhibitor vorkommen. Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, nachzuweisen, inwieweit ein Zusammenhang zwischen dem Anteil von maskiertem Inhibitor im Bronchialsekret und bronchialen Affektionen vorliegt.

Ergebnisteil
=====

Aufgrund der geschilderten Eigenschaften der im Bronchialsekret vorhandenen Inhibitoren kann nun folgendes ermittelt werden:

1. Gesamthemmstoffkonzentration (vor Enteiweißung)
2. Hemmstoffkonzentration nach Enteiweißung
3. α_1 -Antitrypsinkonzentration (immunologisch bestimmt)

Bei der ersten Messung vor Enteiweißung ist, wie schon beschrieben, sowohl die Aktivität des niedermolekularen Inhibitors, als auch des α_1 -Antitrypsin erfaßt.

Bei Messung der inhibitorischen Aktivität nach Enteiweißung ist nur noch freier, nicht an Proteasen gebundener, niedermolekularer Inhibitor vorhanden, da die vorher im Sekret vorhandenen Proteasen gefällt wurden und auch das α_1 -Antitrypsin zerstört wurde.

Mit Hilfe dieser drei Messungen läßt sich der Gehalt an maskiertem niedermolekularem Inhibitor errechnen.

Es gilt also:

geb.niedermol.Inh.=Hemmng. vor Enteiw.-Hemmng. nach Enteiw.

Diese Beziehungen gelten allerdings nur unter der Voraussetzung, daß α_1 -Antitrypsin nicht in größerer Menge in maskierter Form vorliegt, denn diese Größe kann in unseren Messungen nicht erfaßt werden und auch nicht auf rechnerischem Wege ermittelt werden.

Der gemessene α_1 -Antitrypsingehalt läßt sich mit Hilfe fol-

gender Formel in InhibitormilliUnits umrechnen:

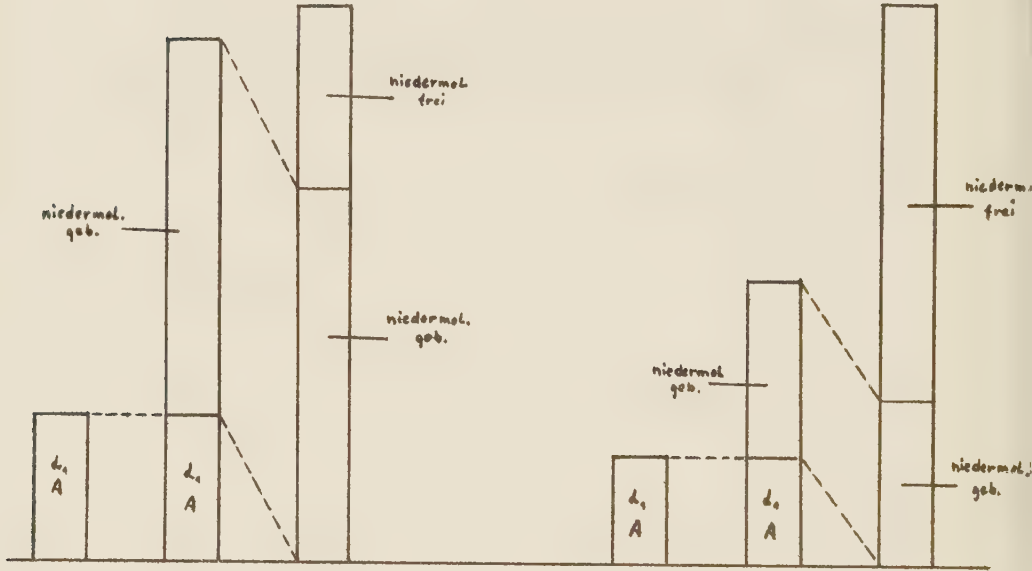
spezifische Aktivität = IMU/ g Protein

$$= \frac{\text{Mgw - Trypsin}}{\text{Mgw } \alpha_1\text{-Antitrypsin}} = \frac{24000}{45000} = 0,53$$

Darstellung der Anteile der verschiedenen Inhibitoren an der Gesamthemmkapazität des Bronchialsekrets. (Durchschnitt aus 62 Fällen)

Kontrollgruppe

Path. Fälle



Prozentuale Verteilung der Inhibitoren auf die Gesamthemmkapazität

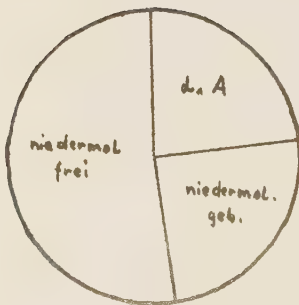


Tabelle. Kontrollgruppe

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Diagnose
15,8	15,8	10,0	5,8	21,6	27	73	63	37	47	Tympanoplastik
5,9	5,1	4,9	1,0	6,1	16	84	96	4	70	Zungen-ca.
9,7	7,7	5,7	4,0	11,7	34	66	74	26	55	Tympanoplastik
11,7	10,5	7,4	4,3	14,8	29	71	70	30	10	Mastoidektomie
6,8	4,6	4,0	2,8	7,4	38	62	87	13	4	Tonsillektomie
10,5	12,1	8,3	2,2	14,3	15	85	68	32	67	Larynx-ca.
9,6	9,6	7,3	2,3	11,8	19	81	76	24	36	Magenulcus
7,0	6,4	3,8	3,2	9,6	33	67	59	41	58	Trachealstenose
9,2	12,0	8,6	0,6	12,6	5	95	72	28	26	Halscyste
5,9	6,5	4,8	1,1	7,6	15	85	74	26	32	Tympanoplastik
9,5	10,2	8,5	1,0	11,2	9	91	82	18	35	Tympanoplastik
8,0	10,5	5,0	3,0	13,5	22	78	47	53	51	Magenulcus
10,4	10,4	9,8	0,6	11,0	5	95	94	6	8	Tonsillektomie
9,2	12,2	7,2	2,0	14,2	14	86	59	41	29	Tympanoplastik
3,1	3,7	2,0	1,1	4,8	23	77	54	46	18	Stirnhöhlenop.
11,0	8,2	8,9	2,1	10,3	20	80	100	0	36	Varizenstripping
8,1	12,8	5,8	2,3	15,1	15	85	48	52	38	Magenulcus
20,0	24,5	16,8	3,2	27,7	12	88	69	31	42	Stimmbandleukoplak
10,5	13,1	8,1	2,4	15,5	15	85	62	38	50	Nasenplastik
4,8	5,8	2,9	1,9	7,7	25	75	50	50	55	Stimmbandleukoplak.
12,6	11,4	9,5	3,1	14,5	21	79	83	17	22	Tonsillektomie

1 st	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Diagnose
18,7	17,8	16,4	2,3	21,1	11	89	92	8	13	Tonsillektomie
3,2	3,2	2,2	1,0	4,2	24	76	69	31	4	Tonsillektomie
12,3	12,3	5,0	7,3	19,6	38	62	41	59	11	Tympanoplastik
3,6	4,4	0,8	2,8	7,2	39	61	17	83	3	Adenotomie
15,1	11,8	10,0	5,1	16,9	30	70	85	15	62	Trachealstenose, Trtr.
14,4	15,6	9,6	4,8	20,4	24	76	62	38	38	Posticusparese, Trtm.
11,5	14,8	9,8	1,7	16,5	10	90	66	34	62	Posticusparese
14,0	12,3	12,1	1,9	14,2	13	87	98	2	62	Trachealstenose
6,6	6,6	3,3	3,3	9,9	33	67	50	50	38	Posticusparese, Trtm.
4,2	4,6	3,3	0,9	5,5	16	84	72	28	29	Reinke-Ödem
7,6	10,1	5,1	2,5	12,6	20	80	50	50	67	Tympanoplastik
22,0	31,5	19,0	3,0	34,5	9	91	60	40	34	Halstumor
10,4	9,4	6,4	4,0	13,4	30	70	68	32	70	Ohrmuschel-ca.
6,0	6,1	4,2	1,8	7,9	23	77	69	31	60	Larynx-ca.
4,5	3,2	2,4	2,1	5,2	41	59	75	25	73	Larynx-ca.
15,8	15,8	5,9	9,9	25,7	38	62	37	63	65	Stimmbandlenkoplakie
Mittelwerte										
10,0	10,6	7,2	2,8	13,4	22	78	67	33	40	

Tabelle. Pathologische Fälle

1**	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Diagnose
4,0	7,9	0,2	3,8	11,7	32	68	3	97	61	Tympanoplastik
3,2	13,0	0,2	3,0	16,0	19	81	2	98	61	Trachealstenose, Trtm.
5,5	8,3	3,3	2,2	10,5	21	79	40	60	62	Larynxleukoplakie
2,6	3,8	0,7	1,9	5,7	33	67	19	81	70	Posticusparese, Trtm.
12,8	24,0	9,4	3,4	27,4	12	88	31	69	28	Hirncontusion, Trtm.
2,8*	9,7	(-2,4)	5,2	14,9	35	65	0	100	68	Laryngektomie
0,7*	2,1	(-0,4)	1,1	3,2	34	66	0	100	66	Laryngektomie
1,0	3,4	0,1	0,9	4,5	20	80	3	97	57	Stimmband-ca.
4,1	10,4	2,3	1,8	12,2	15	85	22	78	42	Horizontalresektion
4,2	7,1	3,1	1,1	8,2	13	87	44	56	63	Posticusparese, Trtm.
3,3	7,9	1,4	1,9	9,8	19	81	18	82	62	Laryngektomie
0,7	1,0	0,0	0,7	1,7	41	59	0	100	53	Larynx-ca. Trtm.
5,4	10,7	3,2	2,2	12,9	17	83	30	70	62	Hirn-Tumor, Trtm.
17,6	25,8	9,4	8,2	34,0	24	76	36	64	72	Trachealstenose, Trtm.
4,5	12,1	3,3	1,2	13,3	9	91	27	73	63	Laryngektomie
7,9	31,4	6,3	1,6	33,0	5	95	20	80	65	Laryngektomie

1^{*}	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Diagnose
$0,5^{*}$	2,4	(-0,8	1,3	3,7	35	65	0	100	75	Stimmband-ca.
$0,0^{*}$	4,6	(-1,2)	1,2	5,8	21	79	0	100	55	chron. Laryngitis
6,4	10,5	4,7	1,7	12,2	14	86	45	55	60	Larynx-ca.
15,6	22,5	15,0	0,6	23,1	3	97	67	33	20	Frontobasale Fraktur, Trtm.
8,4	11,2	6,6	1,8	13,0	14	86	59	41	74	Chordektomie
1,1	1,6	0,6	0,5	2,1	24	76	38	62	60	Trachealstenose, Trtm.
$0,4^{*}$	1,3	(-0,4)	0,8	2,1	38	62	0	100	66	Laryngektomie
8,8	12,0	7,6	1,2	13,2	9	91	63	37	3	TE und Adenotomie
13,2	19,8	8,9	4,3	24,1	18	82	45	55	33	Larynx-ca.
Mittelwerte										
5,4	10,6	3,4	2,2	12,8	21	79	25	75	56	

* Bei diesen Fällen ist die meßbare Hemmkapazität geringer als die immunologisch bestimmte α_1 -Antitrypsinkonzentration erwarten läßt. Es muß angenommen werden, daß in diesen Fällen bis zu 100 % des niedermolekularen Inhibitors und ein erheblicher Teil von α_1 -Antitrypsin in maskierter Form vorliegt.

- 1* Hemmkapazität ImU/mg Sekretprotein
- 2 Hemmwirkung im Überstand der Enteiweißung ImU/mg Ausgangsproteinmenge
- 3 Differenz aus 1 und 2
- 4 α_1 -Antitrypsingehalt in ImU/mg Protein
- 5 Summe aus 1 und 2
- 6 % des auf α_1 -Antitrypsin entfallenden Hemmstoffgehalts
- 7 % des auf niedermolekularen Inhibitor entfallenden Hemmstoffgehalts
- 8 %-Anteil des freien niedermolekularen Inhibitors vom gesamten vorhandenen niedermolekularen Inhibitor
- 9 %-Anteil des maskierten niedermolekularen Inhibitors vom gesamten vorhandenen niedermolekularen Inhibitor
- 10 Alter der Probanden

Aus den vorliegenden Durchschnittswerten und graphischen Darstellungen läßt sich folgendes entnehmen:

1. Bei der Gruppe der pathologischen Fälle ist die Gesamthemmkapazität, die vor Enteiweißung gemessen wurde, niedriger als bei der Kontrollgruppe: um etwa 30 %.
Dies bedeutet, daß also nur halb so viel freier, nicht an Proteasen gebundener Inhibitor vorliegt.
2. Nach Enteiweißung ist in beiden Fällen gleichviel Inhibitor vorhanden, woraus man schließen kann, daß bei den pathologischen Fällen mehr Inhibitor maskiert, d.h. in Verbindung mit Proteasen vorliegt.
3. Berechnet man die auf α_1 -Antitrypsin entfallende Hemmkapazität, so erhält man für die Gruppe der pathologischen Fälle und für die Kontrollgruppe einen gleichen Anteil von etwa 20 %.
4. Vergleicht man das Verhältnis von gebundenem und freiem niedermolekularem Inhibitor bei den beiden Gruppen, so zeigt sich, daß bei den gesunden Kontrollpersonen im Durchschnitt bis zu 70 % niedermolekularer Inhibitor in freier Form vorliegt, während bei der Gruppe der Patienten mit Bronchitiden die Menge des frei verfügbaren niedermolekularen Inhibitors auf etwa 30 % erniedrigt ist.
5. Die α_1 -Antitrypsin-Inhibitorkonzentration steht zur Gesamthemmung in keinem festen Verhältnis, sondern ist vielmehr sehr variabel; eine hohe Gesamthemmkapazität bedeutet also nicht unbedingt eine große Beteiligung von α_1 -Antitrypsin. Sekrete mit hohem α_1 -Antitrypsin-gehalt und niederer Gesamthemmung wurden jedoch nicht beobachtet.
6. Auch das Verhältnis zwischen niedermolekularem Inhibitor und α_1 -Antitrypsin zeigt keine Abhängigkeit. Es ist

durchaus möglich, daß im Sekret eines Patienten viel freier niedermolekularer Inhibitor vorhanden ist, während der α_1 -Antitrypsingehalt gering ist, oder auch umgekehrt.

7. Bei der Gruppe der pathologischen Fälle fällt auf, daß sich für freien niedermolekularen Inhibitor negative Werte ergeben. Diese Tatsache läßt sich dadurch erklären, daß hier der gesamte niedermolekulare Inhibitor und auch ein Teil des α_1 -Antitrypsin in gebundenem Zustand vorliegt.
8. Es ist deutlich zu sehen, daß bei der Gruppe der pathologischen Fälle immer vor Enteiweißung weniger inhibitorische Aktivität gemessen wurde als nachher. Außerdem ist auch die Differenz der Aktivitäten größer als bei der Kontrollgruppe.

Experimenteller Teil =====

Material und Methoden

Sämtliche untersuchten Sekrete wurden bei tracheotomierten, laryngektomierten oder intubierten Patienten durch Absaugen gewonnen. Die Sekrete wurden in 0,05 M Boratpuffer, pH 7,8 aufgenommen.

Bestimmung der Gesamthemmkapazität

Die Gesamthemmkapazität eines Sekrets wird in ImU (= Inhibitor milliUnits) pro mg Sekretprotein angegeben. Eine ImU ist diejenige Inhibitormenge, welche die hydrolytische Wirkung von 1 mU Trypsin (im Falle des Trypsin etwa 1 μ g) gegen N^ε-Benzoyl-arginin-p-nitroanilid aufhebt (25).

Ansatz: In Küvetten d = 1 cm (thermostatisierbares Photometer, 25°C) 10 μ g Trypsin (gelöst in 0,2 ml 0,0025 n HCl), 0,1 - 0,5 ml Sekretlösung (in Abhängigkeit vom Hemmstoffgehalt); Endvolumen 2 ml durch Zugabe von 0,2 M Triäthanolaminpuffer, pH 7,8 einstellen. Nach 5 min Vorinkubation 1 ml Substrat in Wasser zugeben (Endkonzentration = $0,73 \cdot 10^{-4}$ M). Extinktionszunahme pro min bei 450 nm Bestimmen. Extinktionszunahme pro min für 10 μ g Trypsin = 0,033. Eine ImU ist vorhanden, wenn die Extinktion um 0,0033 Extinktionseinheiten vermindert ist.

Exakte Bestimmung des Hemmstoffgehalts ist nur bis zu einer 50 %igen Hemmung durchführbar (26). Der Proteingehalt der Sekrete wird durch die Ninhydrinreaktion in aliquoten Teilen nach alkalischer Hydrolyse bestimmt.

Bestimmung der auf α_1 -Antitrypsin entfallenden Hemmkapazität

Für diese Bestimmung ist es notwendig, die Menge von α_1 -Antitrypsin in einem Sekret zu kennen. Die Gewichtsbestimmung wird immunologisch auf Partigenplatten (Behringwerke) nach der Methode von Mancini (18) durchgeführt. Dazu werden definierte Sekretmengen durch Druckdialyse (Sartorius-Dialysierhülsen) zur Trockne eingengt, der Rückstand in 0,1 M Boratpuffer gelöst und 2 μ l zur α_1 -Antitrypsinbestimmung verwendet.

Prinzip der einfachen radialen Immundiffusion nach Mancini (18).

Das Prinzip dieser Methode besteht darin, daß von einem zylinderförmigen Startloch aus die gelösten Antigenmoleküle radial in eine gleichmäßig dicke, das homologe Antiserum enthaltende Agargelschicht diffundieren und dabei einen Präzipitatzylinder ausbilden. Die kreisförmige Grundfläche des Zylinders ist nach beendeter Diffusion direkt proportional der Menge des Antigens bei vorgegebener Antiserumkonzentration im Reaktionsgel.

Trägt man die Kreisfläche r (= Fläche der Auftragstelle + Fläche des Präzipitates) als Funktion der Antigenmenge Q (= Antigenkonzentration $\cdot$ Volumen der Antigenlösung) in einem Koordinatensystem auf, so resultiert eine geradlinige Beziehung, die der Gleichung:

$$r = K \cdot Q + S$$

gehört (19).

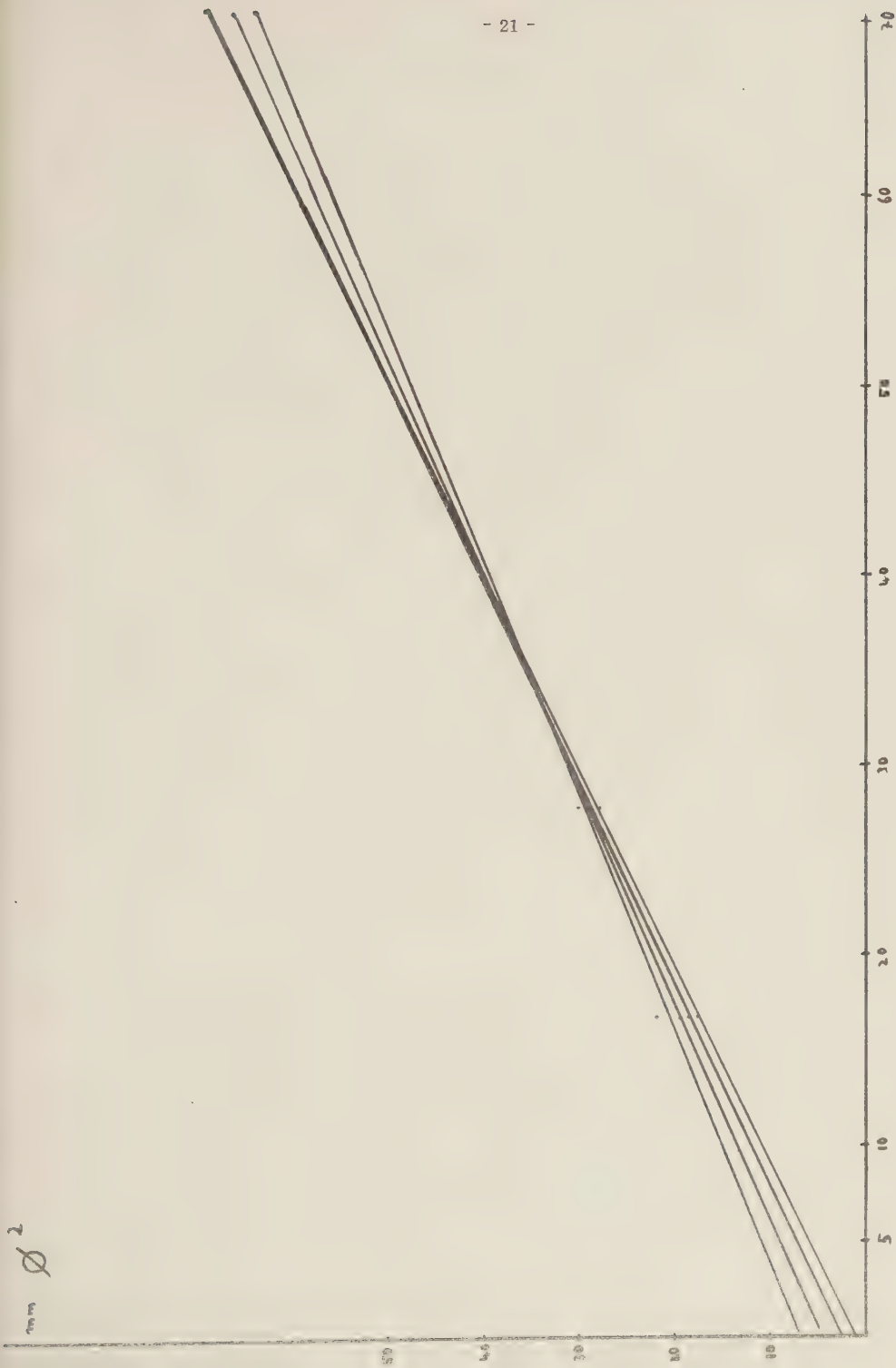
Der Schnittpunkt S der Geraden mit der Ordinate stellt eine Funktion der Größe der Auftragstelle dar; die Steigung K ist umgekehrt proportional der Antiserumkonzentration im Gel sowie dessen Schichtdicke.

Durch geeignete Standardisierungsmaßnahmen gelingt es, diese in K und S enthaltenen Variablen konstant zu halten, so daß der zu messende Radius bzw. Durchmesser des Präzipitatkreises lediglich eine Funktion der aufgetragenen Antigen-Menge ist. Füllt man bei allen Standard- und Analysenproben genau gleiche Volumina der Antigenlösung in die Startlöcher, so erhält man über eine mit Hilfe standardisierter Proteinpräparate aufstellbare Bezugskurve die Antigenkonzentration einer Analysenlösung. Um eine Eichkurve aufzustellen, ermittelt man zunächst die Durchmesser der Präzipitatringe, die sich mit den Standardlösungen entwickelt haben. Würde man die Durchmesser auf linearem Millimeterpapier in Abhängigkeit von der jeweiligen Proteinkonzentration auftragen, ergäbe sich dabei eine leicht nach oben durchgebogene Kurve. Geradlinig verlaufende Bezugskurven erhält man durch Auftragen des Quadrierten Durchmessers bzw. Radius als Funktion der Antigenkonzentration.

In diesem Fall wurden geradlinig verlaufende Bezugskurven angelegt.

Dann werden die Durchmesser der Immunpräzipitate, die sich um die Auftragsstelle der Untersuchungsproben gebildet haben, ausgemessen und auf der Eichkurve die zugehörigen Proteinkonzentrationen abgelesen (19).

Graph.: Eichkurve bei radialer Immundiffusion zur
Antitrypsinbestimmung im Bronchialsekret



Mancini Test: Durchführung und Geräte

Von dem wie bereits erwähnt zur Trockne eingeengten und wieder in Boratpuffer gelösten Sekret werden 2 μ l in einer Mikroliterspritze (Hamilton) aufgezogen und in der Mitte der in der Partigenplatte ausgestanzten Startlöcher aufgetragen. Die Platte muß dabei völlig eben liegen. Drei Startlöcher jeder Platte werden mit drei verschiedenen Verdünnungen der Standardlösung beschickt und dienen zur Aufstellung der Eichkurve.

Als Standardlösung wurde Standard-Human-Serum (Behringwerke) verwendet. Es wurde folgendermaßen verdünnt:

1 : 7

1 : 3

1 : 2

Verdünnungsmittel : physiologische Kochsalzlösung.

Nach dem Beimpfen bleiben die Platten in einer feuchten Kammer stehen, was durch einen angefeuchteten Schwamm und gut schließenden Deckel der Partigen-Platte garantiert ist. Nach 48 Stunden haben sich die Immunpräzipitate in der Gelschicht so deutlich ausgebildet, daß sie gut ausgemessen werden können. Dies erfolgt mit einer Meßschablone, die mit den Partigenplatten mitgeliefert wird.

Da die χ_1 Antitrypsinkonzentration im Standard-Serum bekannt ist, kann die in den drei Eichwerten vorhandene Konzentration errechnet und gegen mm Durchmesser der zugehörigen Immunpräzipitatringe aufgetragen werden. Die restlichen Präzipitatringe müssen nun ausgemessen werden und an der durch die Eichwerte festgelegten Skala kann mit Hilfe der Eichkurve dann die jeweilige χ_1 -Antitrypsinkonzentration abgelesen werden.

Die abgelesene α_1 -Antitrypsinkonzentration wird zuerst auf die α_1 -Antitrypsinkonzentration des vor der Druckfiltration in Boratpuffer gelöst vorhandenen Sekrets umgerechnet. Mit Hilfe der bereits ermittelten Proteinkonzentration läßt sich dann der Gehalt an α_1 -Antitrypsin bezogen auf mg Sekretprotein errechnen.

Zur Umrechnung des α_1 -Antitrypsingehalts in ImU gilt folgende Beziehung:

$$\begin{aligned}\text{spez. Aktivität} &= \text{ImU} / \text{g Protein} = \frac{\text{MgW-Trypsin}}{\text{MgW-Antitrypsin}} \\ &= \frac{24\,000}{45\,000} = 0,53\end{aligned}$$

d.h. 1 μ g α_1 -Antitrypsin hemmt 0,53 g Trypsin bzw.

1 μ g α_1 -Antitrypsin repräsentiert 0,53 ImU gegen Trypsin.

Der Gehalt an α_1 -Antitrypsin, ausgedrückt in ImU, wird auf mg sezerniertes Protein bezogen.

Diskussion

Bei erblichem α_1 -Antitrypsinmangel werden vermehrt Lungenemphyseme beobachtet (6, 7, 8, 9). Dies sagt jedoch nichts über die Pathogenese des Lungenemphysems aus (22), doch diese Tatsache beweist, daß bei Ausfall des inhibierenden Systems in den Alveolen durch erhöhte proteolytische Aktivität das Lungenemphysem entstehen kann. Am Tier kann man durch Papain und andere Proteasen experimentell ein Lungenemphysem erzeugen (23). Auch Versuche, in denen nachgewiesen wird, daß Lungenparenchym durch leukocytaire Proteasen angedaut werden kann, deuten darauf hin, wie notwendig ein ausreichender Inhibitorschutz ist (24).

Weiterhin kann bei Applikation von Proteasen, die nicht durch α_1 -Antitrypsin hemmbar sind, beim Hund eine Überempfindlichkeit der Bronchien gegen konstriktorisch wirkende Substanzen erzeugt werden (25).

Bei all diesen Untersuchungen im Bronchialbereich wurde davon ausgegangen, daß der einzige physiologische Schutz vor proteolytischer Aktivität in einer ausreichenden α_1 -Antitrypsinkonzentration zu suchen sei. Da die Bestimmung der antitryptischen Aktivität im Bronchialsekret meist mit immunologischen Methoden vorgenommen wurde, wurde die gleichzeitige Anwesenheit eines niedermolekularen Proteaseninhibitors übersehen, obwohl dieser sowohl im Sekret des Gesunden als auch des Kranken über 70 % der gesamten Hemmkapazität der Bronchialsekrete darstellt. Man kann annehmen, daß der niedermolekulare Inhibitor als Produkt des Flimmerepithels der oberen Luftwege die Hauptfunktion bei der Inaktivierung leukocyitärer Proteasen im Bronchialbereich innehat.

Da gerade die Luftwege im besonderen Maße infektionsgefährdet sind und hier vermehrt Leukocyten einwandern und

zerfallen, scheint - bei einer teleologischen Betrachtungsweise - die zusätzliche Sekretion eines spezifischen Proteaseninhibitors im Bereich des Flimmerepithels sinnvoll zu sein.

Diese Folgerungen werden durch die Untersuchungsergebnisse gestützt. Wir finden bei Patienten der Kontrollgruppe 70 % des gesamten vorhandenen niedermolekularen Inhibitors in freier Form, während bei Patienten mit Bronchitiden nur 30 % des Inhibitors in aktiver Form vorliegt. Ein Anteil von 70 % reagierte hierbei offenbar bereits in situ mit proteolytischen Enzymen unter Inaktivierung. Die mögliche Maskierung des Inhibitors durch diese Reaktion erklärt auch Befunde von Rasche und Ulmer, die nur in wenigen Fällen einer großen Untersuchungsreihe an Bronchialschleimen außer α_1 -Antitrypsin einen anderen Hemmstoff nachweisen konnten.

In einigen Fällen, bei denen die immunologisch bestimmte α_1 -Antitrypsinmenge höher ist als die beobachtete Hemmkapazität, muß angenommen werden, daß praktisch die Gesamtmenge des niedermolekularen Inhibitors und ein erheblicher Teil des α_1 -Antitrypsins in maskierter Form vorliegen muß.

Interessanterweise zeigt sich - beobachtet man die einzelnen Fälle - keine Korrelation zwischen α_1 -Antitrypsingehalt und Gesamthemmung. Diese Feststellung wurde auch in Versuchsreihen von Rasche, Marcic und Ulmer gemacht (26). Außerdem wurde in diesen Arbeiten auch keine Korrelation der α_1 -Antitrypsinspiegel im Blut zur proteolytischen Aktivität im Sputum gefunden.

Mögliche Schlußfolgerungen, die sich aus diesem Phänomen ziehen lassen, sind:

1. daß α_1 -Antitrypsin und niedermolekularer Inhibitor eine sehr unterschiedliche Affinitätskonstante gegen Leukozytenproteasen besitzen und daß α_1 Antitrypsin sich nur zu einem geringen Teil mit Proteasen verbindet, während den hauptsächlichsten Anteil der Hemmkapazität

der niedermolekulare Inhibitor hat, und das restliche α_1 -Antitrypsin auf die Hemmkapazität keinen Einfluß hat oder nur unter besonderen Umständen aktivierbar ist.

2. Daß von α_1 -Antitrypsin in diesem Falle gar keine Hemmwirkung gegen Leukocytenproteasen ausgeht, sondern nur vom niedermolekularen Inhibitor, wobei sich allerdings die Frage aufwirft, welche Funktion das α_1 Antitrypsin im Bronchialsekret besitzt. Der Gedanke, daß es sich da rein zufällig findet, macht diese Hypothese wieder sehr unwahrscheinlich.

3. Daß es immer ein sehr unterschiedlicher Anteil des gesamten α_1 -Antitrypsin ist, der in Komplexbindung mit Proteasen vorliegt und dadurch der Messung entgeht, während nur das freie α_1 -Antitrypsin gemessen wird.

Versuche zu dieser Überlegung wurden unternommen.

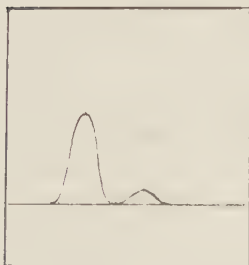
Bei allen Untersuchungen wurde - wie auch aus den anderen Veröffentlichungen hervorgeht - als einzige Meßmethode für α_1 -Antitrypsin die radiale Immundiffusion verwendet. Diese Methode beruht darauf, daß die Menge des Antigens proportional ist der Größe des Präzipitatzyllinders; vorausgesetzt, daß die Moleküle alle gleich groß sind. Trifft dies jedoch nicht zu, so werden entsprechend der Immunelektrophorese die kleineren Moleküle weiter wandern, während die größeren zurückbleiben, d.h. sie beeinflussen die Weite des Präzipitattringes nicht.

Aufgrund dieser Überlegung wurde eine Elektrophorese durchgeführt.

Die Elektrophorese (Fotografie) zeigt deutlich, daß zwei Teile unterschiedlicher Wanderungsgeschwindigkeit, d.h. Molekülgröße vorhanden sind. Dies entspricht dem freien bzw. komplexgebundenen α_1 -Antitrypsin.

Überträgt man diese Beobachtung auf das Prinzip der Radialimmundiffusion, so muß man mit großer Wahrscheinlichkeit annehmen, daß dieser Anteil des α_1 -Antitrypsin auf das Meßergebnis keinen Einfluß hat, d.h. es wird durch keine der angewendeten Meßmethoden erfaßt.

Wie groß in jedem einzelnen Fall der komplexgebundene Anteil des α_1 -Antitrypsins ist, konnte durch diese Messung nicht ermittelt werden. Es wird der Gegenstand weiterer Arbeiten sein, durch Meßreihen die jeweils gebundene α_1 -Antitrypsinmenge bei den einzelnen Fällen quantitativ zu bestimmen.



Zusammenfassung

Die hauptsächlichen Ergebnisse dieser Untersuchungen sind folgende:

1. Es konnte, wie schon in anderen Arbeiten beschrieben wurde, die Existenz eines bisher unbekannten niedermolekularen Proteaseninhibitors im Bronchialsekret bestätigt werden.
2. Dieser Inhibitor liegt teils als frei verfügbare aktive Substanz vor, teils als maskierter, an Proteasen gebundener Hemmstoff, der durch denaturierende Enteiweißung freigesetzt werden kann. Es zeigte sich, daß bei gesunden Patienten 70 % des gesamten vorhandenen niedermolekularen Inhibitors in freier Form vorliegt, während bei Patienten mit Bronchitiden nur 30 % des Inhibitors in aktiver Form vorliegt.
3. Es stellte sich heraus, daß sowohl beim Sekret Gesunder als auch Kranker der Anteil des α_1 -Antitrypsins an der Gesamthemmkapazität jeweils 20 % ausmacht, wobei man berücksichtigen muß, daß es sich bei der immunologisch gemessenen α_1 -Antitrypsinmenge nur um freien Hemmstoff handelt, während der komplexgebundene Anteil des α_1 -Antitrypsin durch diese Messung nicht erfaßt wird.
4. Es zeigte sich keine Korrelation zwischen α_1 -Antitrypsinwerten und Gesamthemmung sowie α_1 -Antitrypsinspiegel und zugehörigen Werten von gebundenem und freiem niedermolekularem Inhibitor sowie deren Differenz.

Literaturverzeichnis

1. Hochstraßer K., Muss, Werle
Z.physiol.Chem. 348, S. 1337 - 1340
(Nov. 1967)
2. Ozawa, K. und Laskowski jr.
I.Biol.Chem. 241, 3955 (1966)
3. Hochstraßer K., Schwarz S., Ilchmann K., Werle E.
Z.physiol.Chem. 349 (Nov. 1968)
4. Fritz H., Fink E., Gebhard M., Hochstraßer K., Werle E.
Z.physiol.Chem. 350 (Aug. 1969)
5. Proceedings Int. Res. Conf. on Proteinase Inh.
(Fritz N. u. Teschesche H. - Hrsg.)
W. de Gruyter Berlin
6. Laurell C.B.
Scand.I.Clin.Lab.Inv. 28, 1-4 (1971)
7. Meiers h.g., Beisenherz D., Brüster H., Strassburger D.,
Greuel H.
Dtsch.med.Wschr. 93, 1633 (1968)
8. Talamo R.C.
Man.I. of Allerg. and Clin. Immunol.
48, 340 (1971)
9. Varpela E., Saris N.E.
Ann.of Clin.Res. 3, 46 (1971)
10. Liebermann I., Gawad M.A.
I.Lab.Clin.Med. 77, 713-727 (1971)
11. Schultze H.E., Göllner I., Heide K., Schönenberger M.,
Schwick G.
Z.Naturforsch 10b 463 (1955)
12. Schultze H.E., Heide, K., Haupt H.
Klin.Wschr. 40, 427 (1962)
13. Fritz H., Heimbürger N., Meier M., Arnhold M.,
Zaneveld I.J.D. u. Schumacher G.F.B.
Z.physiol.Chem. 353 1953-1956 (Dez.1972)
14. Hochstraßer K, Schuster R., Reichert R., Heimbürger N.
Z.physiol.Chem. 353 1120-1124 (72)
15. Hochstraßer K, Reichert R., Schwarz S., Werle E.
Z.physiol.Chem. 1353, 221

16. Reichert R., Hochstraßer K.
Z.Laryng, Rhinol. 51, 190 (1972)
17. Hochstraßer K., Reichert R., Matzner M., Werle E.
Z.Klin.Chem. u. Klin.Biochem. 10
1304 (72)
18. Mancini G., Carbonara A.O., Heremans I.F.
Immunochemistry 2, 235 (1965)
19. Zeitschr. f.Klin.Chemie u. Klin. Biochemie
Sonderdr. Heft 3 S. 113-122 (1968)
20. Geisler L.S., Bachmann G.W., Laumen F., Nolte, D.,
Wentzel H. u. Rost H.D.
Dtsch.med.Wschr. 329 (1972)
21. Kilburn K.H., Dowell A.R., Pratt P.C.
Arch.Intern.Med. 127, 884 (1971)
22. Rasche B., Ulmer W.T.
Pneumologie 144 10-32 (1971)
23. Ulmer W.T., Islam M.S., Bakran I. jr.
Dtsch.med.Wschr. 96 1759-1763 (1971)
24. Rasche B., Marcic I. u. Ulmer W.T.
Pneumonologie 146 321-350 (1971)
25. Fritz H., Trautschold I., Werle E.
In: Methoden der enzym. Analyse
(Hrsg. H.U. Bergmeier)
2. Aufl. Bd. 1, 1021-1038
Weinheim/Bergstr., Verlag Chemie
26. Hochstraßer K., Reichert R., Schwarz S., Werle E.
Z.physiol.Chemie 353, 221-226 (1972)

Meinem verehrten Doktorvater sei hiermit herzlich gedankt für die Überlassung des Themas und für die großzügige Förderung, die er in jeder Hinsicht meiner Arbeit hat zukommen lassen.

Ich danke Herrn Professor Dr. Naumann als dem Direktor der HNO-Klinik für den Arbeitsplatz, den er mir in seiner Klinik zur Verfügung gestellt hat.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. Reichert für die freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Lebenslauf

Am 24.4.1948 wurde ich als 5. Kind des evangelischen Pfarrers Karl Conradi und seiner Ehefrau Hedwig, geb. Brödel in Meersburg geboren. Ich besuchte in Meersburg die Volksschule, dann ab 1959 in Konstanz das Gymnasium bis zum Abschluß mit der Reifeprüfung im Juni 1967. Im November 1967 immatrikulierte ich mich an der Universität München und studierte zunächst Germanistik und Philosophie. Nach dem 2. Semester wechselte ich zur Medizin über und bestand nach dem 2. Fachsemester die naturwissenschaftliche Vorprüfung und nach dem 5. Fachsemester im April 1971 das Physikum. Im Oktober 1972 begann ich meine Dissertation. Ich befinde mich jetzt im 5. klinischen Semester und beabsichtige im kommenden Frühjahr das Staatsexamen abzulegen.

